

ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR E DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LARANJAS EM DECOMPOSIÇÃO

Gabriel do Amaral Minussi

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

gabrielminussi@outlook.com

Aline P. Dresch

*Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental, Campus Palotina,
Laboratório de Resíduos Sólidos, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

Bruna Caline

*Laboratório de Resíduos Sólidos, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

Luciene R. Adorno

*Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul*

Eduardo Dias Fenner

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

Guilherme M. Mibielli

*Laboratório de Resíduos Sólidos, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

João P. Bender

*Laboratório de Resíduos Sólidos, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

Sérgio Luiz Alves Júnior

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Campus Cerro Largo,
Laboratório de Bioquímica de Leveduras, Campus Chapecó
Universidade Federal da Fronteira Sul.*

slalvesjr@uffs.edu.br

Eixo 02: Ciências Biológicas

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor global de frutos, especialmente laranjas. O descarte inadequado desses resíduos polui o ambiente e prejudica o comércio. Este estudo foca em usar leveduras isoladas de laranja decompostas para avaliar seu crescimento e atividade pectinolítica. Esses microrganismos

ISSN 2764-958X

foram coletados, cultivados e testados em meios de cultura contendo, alternadamente, pectina bruta e purificada, casca de laranja desidratada e triturada, glicose ou galactose. Os resultados mostraram que as leveduras foram capazes de crescer metabolizando as diferentes fontes de carbono utilizadas. Foi observado leveduras com capacidade pectinolíticas, sugerindo potencial para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Casca de laranja. Galactose. Glicose. Pectina. Resíduo.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor global de frutos frescos e transformados, atrás apenas da China e Índia (SILVA *et al.*, 2014). A produção e processamento da laranja doce (*Citrus sinensis*) representam um mercado robusto, liderado pelo Brasil, principal produtor e exportador global (KANASHIRO *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2017). Dentre os principais componentes da casca da laranja a pectina tem lugar de destaque (AYALA *et al.*, 2021).

No entanto, o descarte inadequado desses resíduos agroindustriais gera poluição ambiental e déficit comercial. Esses resíduos poderiam ser aproveitados em processos biotecnológicos, que utilizam esses descartes como substratos para leveduras na produção de biomoléculas para diversas aplicações, resultando em produtos valiosos para indústrias farmacêuticas e alimentícias (FLEURI *et al.*, 2014; GOULA; LAZARIDES, 2015).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de leveduras selvagens, isoladas de laranjas, em meios com carboidratos encontrados nos resíduos de frutas.

MATERIAIS E MÉTODOS

As leveduras utilizadas foram isoladas de laranjas em decomposição. Uma amostra de 1g dos frutos foi coletada e usada para a inoculação em um meio líquido YNB (0,67% de base nitrogenada de levedura) com 0,02% de cloranfenicol e 1% de xilose. Subsequentemente, foi realizado um processo de esgotamento por estriamento utilizando os mesmos reagentes mencionados anteriormente, porém com a adição de 2% de ágar em placas de Petri. Após o esgotamento, as placas foram incubadas a 30°C por 48h e 38 colônias com morfologia de levedura foram isoladas e reservadas como culturas puras em criotubos a -80°C.

Depois do isolamento, foram analisados os perfis de crescimento celular de cinco das linhagens isoladas: CHAP-059, CHAP-063, CHAP-067, CHAP-076 e CHAP-082. As células foram cultivadas em meios YP (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, pH 7,0) contendo, alternadamente, 1% de pectina bruta, 1% de pectina purificada (Sigma-Aldrich), 1% de casca de laranja desidratada e triturada, 1% de galactose ou 1% de glicose. As leveduras também foram testadas em meios com pectina ou casca juntamente com 50mg/L da enzima pectinase

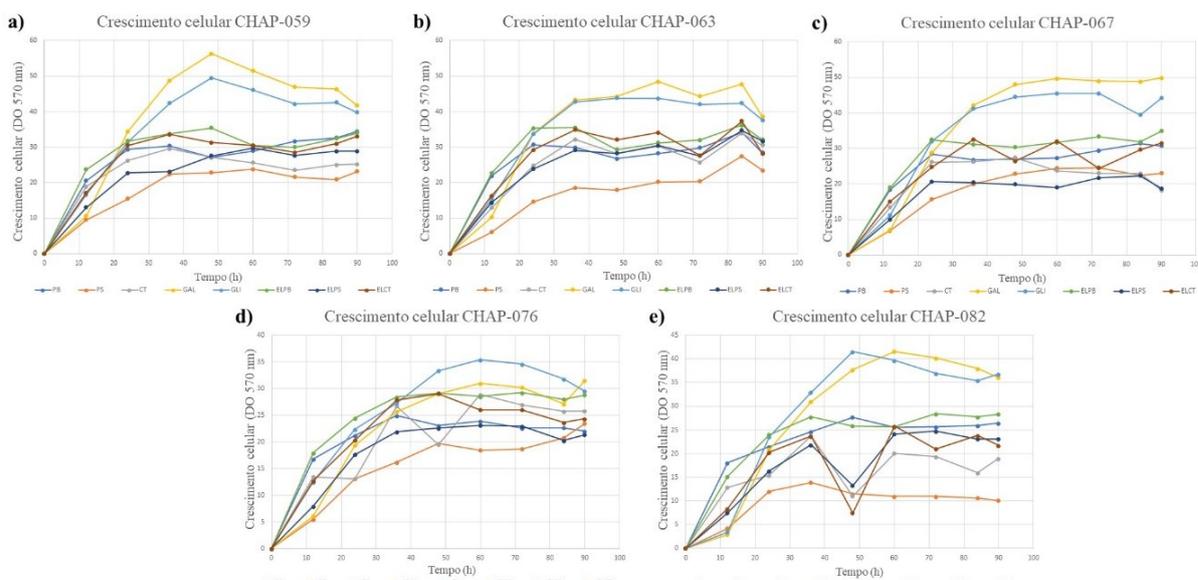
de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich), conforme descrito por (MA *et al.*, 2016). Os cultivos foram conduzidos a 30°C e 145rpm por 90h. Dentro desse período, foram realizadas coletas a cada 12h para acompanhar o crescimento celular das leveduras por espectrofotometria (densidade óptica – DO) a 570nm. Ao fim das 90h de cultivo em pectina purificada, 1mL de cada meio foi centrifugado (3min, 9000rpm) e seu sobrenadante foi reservado em microtubo no gelo. Na sequência, 10µL do sobrenadante foram misturados a 15µL de tampão de succinato-tris (0,15M, pH 5) contendo 1% de pectina. Como controle negativo, foram utilizados os respectivos meios de cultura não inoculados. As reações foram conduzidas em microplacas de 96 poços incubadas por 1h a 30°C e a 50°C. Depois dessa incubação, o ácido galacturônico oriundo da hidrólise da pectina foi determinado por DNS conforme descrito por Albarello *et al.*, (2023).

Os meios confeccionados com casca de laranja e pectina bruta foram preparados a partir de resíduos de laranjas de um restaurante de Chapecó/SC. As cascas foram secas em estufa e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. O material foi peneiramento até a granulometria desejada (< 60mm). Para a extração de pectina, 15g de cascas trituradas foram adicionados em 200mL de HCl 0,5M, pH 2. A extração foi realizada em agitador mecânico a 650rpm e 80°C por 2h. A fração rica em pectina foi precipitada com etanol 95% na proporção de 1:2 por 1h e 4°C. A pectina foi então filtrada, lavada com etanol e seca em estufa a vácuo a 60°C até atingir peso constante. A pureza da pectina foi determinada com base no teor de proteína (pureza (%) = 100 – teor de proteína) pelo método Kjeldahl, empregando fator de correção de 6,25 para nitrogênio total. O método de extração ácida obteve 11,75% de pectina (18,88g/L) com grau de pureza de 92,83%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas a cepas testadas foram capazes de crescer nos meios de cultura contendo as diferentes fontes de carbonos fornecidas (Figura 1). Os meios de culturas com glicose e galactose foram os que proporcionaram maior crescimento, devido ao fato de serem fontes de carbonos menos complexas do que as moléculas de pectina e outras moléculas encontradas nas cascas de laranjas (AYALA *et al.*, 2021).

Figura 1 – Crescimento celular das leveduras em meios com pectina bruta (PB), pectina purificada da Sigma-Aldrich (PS), casca de laranja triturada (CT), galactose (GAL), glicose (GLI) e acrescidos de enzima (EL) — pectinase de *A. niger*.

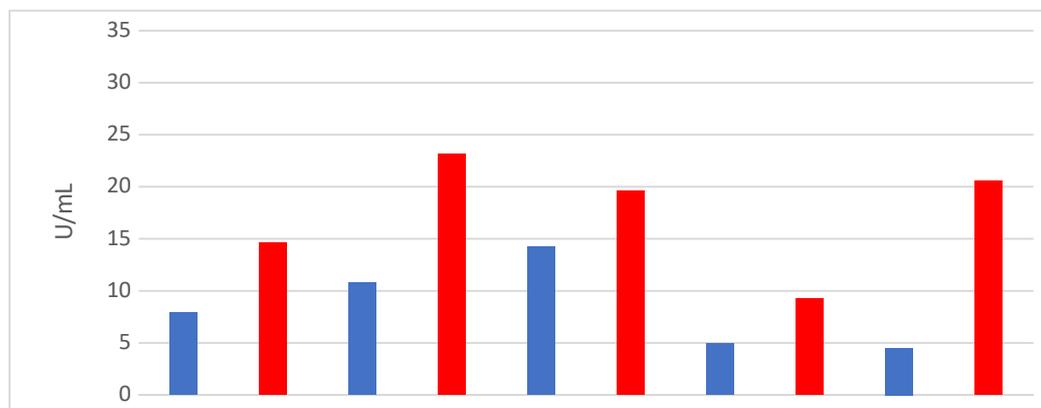


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A pectina é uma classe de heteropolissacarídeos complexos contendo ácido galacturônico, galactose e glicose (MA *et al.*, 2016). Nos meios acrescidos de pectinase de *A. niger*, as leveduras tiveram desempenho ligeiramente superior ao observado nos meios sem adição de enzima.

Os resultados dos ensaios de atividade enzimática estão discriminados na figura 2, onde se pode notar que em todas as cepas testadas foram identificadas atividades pectinolíticas nos meios contendo a pectina purificada da Sigma-Aldrich (nesses meios, não houve adição prévia da pectinase de *A. niger*). Os dados estão apresentados como U/mL, onde uma unidade (U) corresponde a 1nmol de ácido galacturônico liberado por minuto a 30°C e 50°C. A CHAP-067 apresentou o maior desempenho a 30°C dentre as cepas testadas. Já em 50°C, a CHAP-076 apresentou o melhor desempenho.

Figura 2 – Atividade pectinolítica nos meios após cultivo das leveduras.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As aplicações de preparação enzimática são limitadas pelo elevado custo das enzimas de pectinase (MA *et al.*, 2016). Desse modo, obter linhagens de leveduras capazes de promoverem essa quebra em frações menores é extremamente desejável, o que demonstra o potencial biotecnológicos desses microrganismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através dos experimentos de crescimentos celular e atividade enzimática sugerem que as diferentes cepas de leveduras utilizadas são capazes de crescer em diferentes meios de cultura. Os dados indicam também que essas leveduras secretam pectinases que podem ter aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com fomento das instituições UFFS, FAPESC, CNPq e CAPES. Os autores agradecem a Siumar P. Tironi pelo fornecimento das laranjas em decomposição das quais foram isoladas as leveduras.

REFERÊNCIAS

- ALBARELLO, M. L. R.; GIEHL, A.; TADIOTO, V.; DOS SANTOS, A. A.; MILANI, L. M.; BRISTOT, J. C. S.; TRAMONTIN, M. A.; TREICHEL, H.; BERNARDI, O.; STAMBUK, B. U.; ALVES, S. L. Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Bioenergy Research**, v. 1, p. 1–12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/doi.org/10.1007/s12155-023-10616-4>. Acesso em: 26 ago. 2023.
- AYALA, J. R.; MONTERO, G.; CORONADO, M. A.; GARCÍA, C.; CURIEL-ALVAREZ, M. A.; LEÓN, J. A.; SAGASTE, C. A.; MONTES, D. G. Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1348, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26051348>. Acesso em: 24 ago. 2023.
- FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. H. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M. de L. C.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterisation and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 12, p. 2585–2591, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12589>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- GOULA, A. M.; LAZARIDES, H. N. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 45–50, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.003>. Acesso em: 23 ago. 2023.

KANASHIRO, A. M.; AKIYAMA, D. Y.; KUPPER, K. C.; FILL, T. P. *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 606852, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.606852>. Acesso em: 23 ago. 2023.

MA, X.; ZHANG, L.; WANG, W.; ZOU, M.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Synergistic Effect and Mechanisms of Combining Ultrasound and Pectinase on Pectin Hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 7, p. 1249–1257, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11947-016-1689-Y/FIGURES/4>. Acesso em: 23 ago. 2023.

NEETHU, C. S.; MUJEEB RAHIMAN, K. M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A. V.; MOHAMED HATHA, A. A. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 703–709, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.002>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SHARMA, K.; MAHATO, N.; CHO, M. H.; LEE, Y. R. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29–46, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.006>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SILVA, L. M. R. da; FIGUEIREDO, E. A. T. de; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W. de; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>. Acesso em: 23 ago. 2023.